

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11718

研究課題名（和文）新規二相性リン酸カルシウムセメントの歯内療法への応用に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study of novel biphasic calcium phosphate cement for endodontic applications

研究代表者

林 誠（HAYASHI, Makoto）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00301557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）： Mineral trioxide aggregate (MTA) は代表的な歯内療法セメントであるが、操作性の改善の必要性なども指摘されている。近年、粉の粒子中に tricalcium phosphate と tetracalcium phosphate が均一に分散して均一二相性の特徴を持ち、液は酸性リン酸カルシウム溶液から構成される、新規 calcium phosphate cement (CPC) が開発された。本研究において、本材の歯内療法への有用性を解析した。本材の効果時間は約7分とMTAより短く、辺縁封鎖性、生体親和性、歯髄組織内の反応はMTAと近似しており、その有用性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯内療法に使用するセメントとして、Mineral trioxide aggregate (MTA) は高い生体親和性や封鎖性、硬組織形成促進作用など多くの特徴があり、代表的な材料である。しかしながら硬化時間が長く操作性の改善なども指摘されており、価格自体も他のセメントと比較して高価な材料である。本研究で使用した新規CPCはMTAの問題点を解決し、新しい歯内療法セメントとして臨床応用できる可能性がある。さらに、セメントの粉も均一であり、価格自体も安価で製作できるため、多くの利点を有している。

研究成果の概要（英文）： Mineral trioxide aggregate (MTA) is a promising biomaterial in endodontic treatments. However, a disadvantage of this material is its difficult handling properties, namely, relatively long setting times. Thus, a need has been identified for the development of materials more suitable for endodontic treatments. Aim of this study was to develop novel biphasic calcium phosphate cement (CPC), consisting of tricalcium phosphate-tetracalcium phosphate as only solid phase and calcium phosphate solution as liquid phase, for endodontic applications. Setting time (ST) and sealing ability were analyzed. Cement biocompatibility was assessed using osteoblasts. Histopathological aspects in rats were also examined when used for direct pulp capping.

ST was about 7 min, and novel CPC demonstrated similar sealing ability and biocompatibility as that of MTA. These results suggest that novel CPC may be useful for endodontic applications.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯内療法用セメント リン酸カルシウム 二相性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで歯内療法領域で使用されてきたセメントは、酸化亜鉛ユーージノールセメント、水酸化カルシウム系セメント、ガラスイオノマーセメントおよびレジン系材料などが、症例によって適宜選択使用されてきた。1990年代以降、Torabinejadらにより開発された Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は高い生体親和性、辺縁封鎖性および硬組織形成促進作用などを持つことから、多くの症例で使用されるようになった (M. Torabinejad *et al.*, *J Endod* 1999;25:197-205)。その適応範囲は逆根管充填、穿孔封鎖、直接覆髄およびアペキシフィケーションなど多岐にわたっているが、近年では根末完成歯における再生歯内療法にも推奨されている (M. Namour *et al.*, *Scientific World Journal* 2014; 737503: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/737503>)。しかしながら MTA の硬化時間は約 3 時間を要し他のセメントと比較すると最も長いことや、MTA の混和後の状態は狭小な場所に充填するには難しいため操作性の改善なども指摘されており (M. Pairokh *et al.*, *J Endod* 2010;36:400-413)、材料の価格自体も高価であると認識されている (Mooney GC *et al.*, *Dent Traumatol* 2008;24:65-69)。そのため後継材料の開発が急務であり、現在では開発当初の MTA の組成を改変した新規 MTA が紹介されているが、生体に及ぼす影響を含め有用性に関する事項には不明な点が多く残されている。したがって、これらの MTA の問題点を解決した新たな歯内療法用セメントの開発は临床上、非常に有用であると考えられる。

(2) 研究代表者は歯内療法用セメントに関する基礎的研究を継続して行っており、MTA は水酸化カルシウム製材と比較して優れた硬組織形成促進作用と高い細胞遊走能および細胞増殖能が認められ、遊離するカルシウムイオンが関与することを明らかにした (M. Hayashi *et al.*, *Int Endod J* 2006;39:415-422, 林 誠 他, *日歯保存誌* 2006;49:159-167, 林 誠 他, *日大歯学* 2007;81:145-150)。さらに、MTA から遊離するカルシウムイオンは未分化間葉系細胞の細胞質に直接取り込まれ、骨芽細胞への分化・誘導に関与することも報告した (M. Hayashi *et al.*, *J Endod* 2013;39:68-75, M. Hayashi *et al.*, *J Hard Tissue Biology* 2013;22:13-18)。そこでカルシウムイオンが歯内療法用セメントとして重要な要件の 1 つであると考え、水分の介在でヒドロキシアパタイトを形成する Calcium Phosphate Cement (CPC) に着目し、MTA の問題点を改善した新たな歯内療法用セメントへの応用について検討を始めた。これまでに、CPC 粉末とグリセロールをあらかじめ混和させ、歯内療法用に操作性を改善させたときの骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響 (M. Hayashi *et al.*, *Dent Mater J* 2012;31:92-97)、CPC にフッ化物やケイ酸カルシウムを添加してフルオロアパタイトを形成させた時の結晶性、吸収性などの材料学的特性、生体親和性および硬組織形成細胞に及ぼす影響 (M. Hayashi *et al.*, *Jpn J Conserv Dent* 2016 (in press), M. Hayashi *et al.*, *J Res Natl Inst Stand Technol* 2010; 115:267-276, M. Hayashi *et al.*, *J Oral Sci* 2015;57:25-30, M. Hayashi *et al.*, *Dent Mater J* 2015;34:263-269) などについて検討を行ってきた。

(3) 研究代表者は次の研究段階として、近年開発された新しい CPC の歯内療法用セメントへの応用について起案した。CPC 粉末は基本的に 2 種類以上のリン酸カルシウムおよびカルシウム化合物から構成されており、実際に申請者も tetracalcium phosphate (TTCP)、dicalcium phosphate anhydrous (DCPA) および calcium carbonate (CaCO₃) などを別々に調製・粉砕し、混合粉末として使用してきた。このような粉末の粒度分布は多峰性を示すため、溶液と混和した際に均一に混ぜることは困難となり、ヒドロキシアパタイトの転化に影響を及ぼす。粒度分布が CPC の硬化反応における重要な要因であるため、近年 CPC 粉末として α -tricalcium phosphate (α -TCP) と TTCP の粉末が同じ粒子中で均一に分散し単峰性粒度分布を示す均一二相性の特徴を持った新規 CPC が開発された (Sugawara *et al.*, *J Dent Res* 2015;94(spec iss A):3557)。すなわち、この新規 CPC は迅速かつ高率にヒドロキシアパタイトへ転化することが可能である。そこで申請者は次の研究段階として、本材の歯内療法用セメントへの応用を考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の背景により近年開発された単峰性粒度分布を示しながら均一な二相性の特徴を持つ新規 CPC に着目し、MTA の問題点を改善するために本材料の歯内療法への有用性を *in vitro* および *in vivo* で解析し、新しい歯内療法用セメントとして実用化の一助にすることである。

3. 研究の方法

(1) 材料学的特性に関する解析

供試材料

供試材料として使用した新規 CPC は歯内療法用セメントとしての操作性を考え、powder は α -TCP と TTCP (Ca/P 比: 1.8, 平均粒径 10.49 μm)、liquid はリン酸カルシウム溶液 (pH 2.1) を蒸留水で 3.5 倍に希釈した溶液を用いた。新規 CPC は P/L 比 3.0 で 30 秒間練和した。

硬化時間の測定

新規 CPC の硬化時間をギルモア針にて室温 23℃，相対湿度 50% の条件下で測定した。なお，硬化時間は練和開始から痕跡が残らなくなるまでの時間とした。

経時的な粘度変化の測定

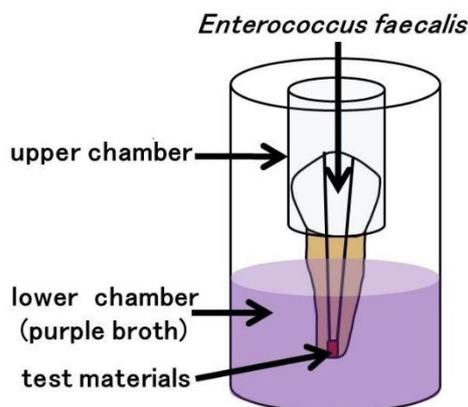
新規 CPC 練和後の経時的な粘度変化は，ISO 6876 に準じた方法で測定した。すなわち，練和したセメント泥 0.05 mL をガラス練板上に採り，練和開始後 1 分ごとに 120 g の荷重を加え，10 分後に広がった試料の最大部と最小部の長さを測定し，平均値を算出した。

カルシウムイオンの溶出量の測定

新規 CPC から遊離するカルシウムイオン濃度の測定は，練和後，直径 9.0 mm，厚さ 3.0 mm のペレット状に調製し，37℃，湿度 100% の条件下で 24 時間硬化させた後， α -minimum essential medium (α -MEM) 中に浸漬した。その後， α -MEM に溶出したカルシウムイオン濃度の経時的变化を Calcium E-test Wako を用いて 7 日間測定した。

(2) 辺縁封鎖性に関する解析

ヒト単根新鮮抜去歯を日本大学歯学部附属歯科病院研究倫理委員会の承認のうえ患者より供与を受け，ニッケルチタンロータリーファイル (ProTaper, Dentsply) にて根管拡大形成を行い，根尖部を約 3 mm 切除する。根尖は超音波レトロチップにて逆根管充填窩洞を形成し，上記の供試材料を充填した。辺縁封鎖性試験は split chamber 法 (JN. Fransen *et al.*, J Endod 2008;34:725-727) にて右図のように漏洩試験を実施した。すなわち，upper chamber には抜去歯を設置・固定し，lower chamber には細菌漏洩の評価のために purple broth を入れた。根管にはメチレンブルーや口腔内細菌などを挿入し，37℃，湿度 100% の条件下で一定期間評価した。なお，対照材料として MTA を使用した。



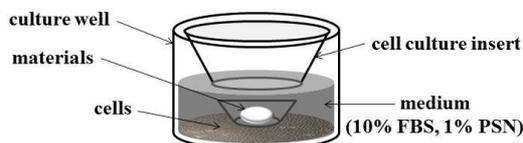
(3) 硬組織形成細胞に与える影響

培養細胞と培養方法

使用する硬組織形成細胞 (MC3T3-E1) は，申請者の教室でこれまで行ってきた方法 (Hayashi M *et al.*, J Endod 2013;39:68-75) に準じ，カルチャーインサートにて培養した。

細胞の増殖とアルカリフォスファターゼ活性に与える影響

供試材料が細胞増殖に与える影響は Cell Counting Kit を使用し，アルカリフォスファターゼ活性に与える影響は Paranitrophenol-phosphate を利用した比色法にて経時的に計測した。



細胞培養方法

(4) 実験動物を使用した歯内療法処置における病理組織学的解析

全身麻酔下において生後 7 週齢の雄性ラットの臼歯部に，歯内療法処置として直接覆髄処置を行った。その際，新規 CPC を覆髄剤として使用した。飼育期間 2 週ならびに 4 週後に切片を作成し，病理組織学的検索には H-E 染色を行って解析した。なお，対照材料として MTA を使用した。

4. 研究成果

(1) 材料学的特性に関する解析

硬化時間を測定したところ、新規 CPC の硬化時間の平均は、およそ 7 分であった。

経時的な粘度変化を測定したところ、新規 CPC の練和開始 1 分後は約 16 mm であったが 5 分まで経時的に減少し、6 分以降は 3 mm でほぼ一定であった (図 1A)。

カルシウムイオンの溶出量を測定したところ、新規 CPC からカルシウムイオンの溶出は認められなかった (図 1B)。

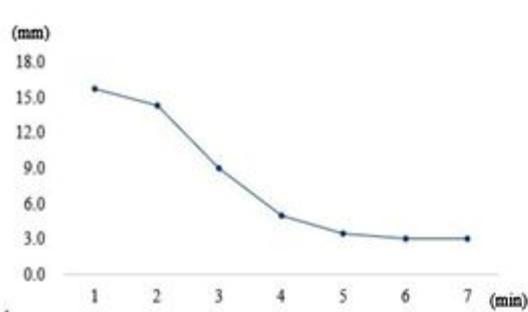


図1A.経時的な粘度変化

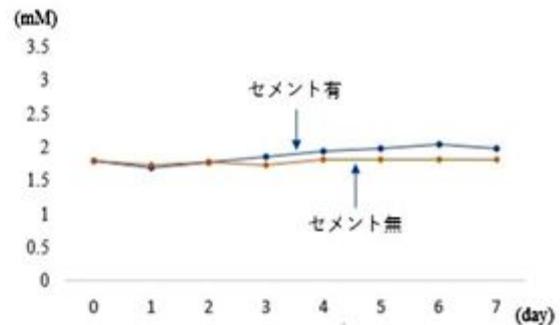


図1B.カルシウムイオン濃度

(2) 辺縁封鎖性に関する解析

新規 CPC は対照材料の MTA より辺縁封鎖性は低い傾向であったが、統計学的有意差は認められなかった。

(3) 硬組織形成細胞に与える影響

骨芽細胞由来の細胞株である MC3T3-E1 細胞と新規 CPC を共培養したところ、細胞の増殖状態やアルカリフォスファターゼ活性に与える影響も MTA と同等であり、高い生体親和性が推察された。

(4) 実験動物を使用した歯内療法処置における病理組織学的解析

実験動物を使用して覆髄処置を新規 CPC にて行ったところ、約 3 週で露髄面の炎症像は消失し、細胞の集積と線維化を認め、MTA と同様な組織反応であった (図 2A, B)。

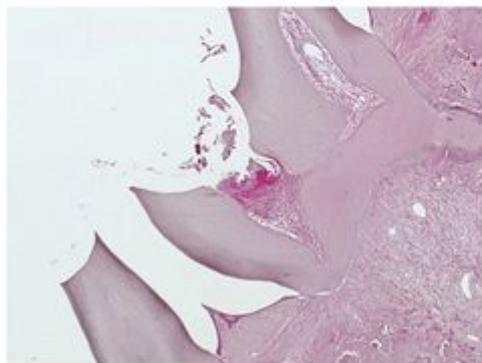


図 2 A. 露髄面の弱拡大

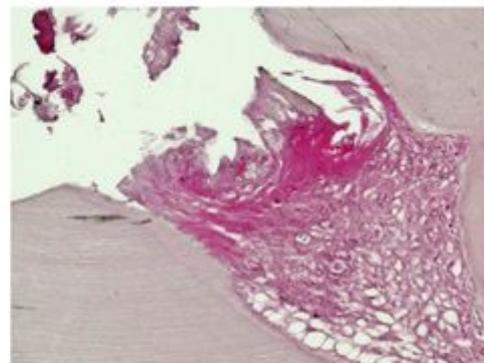


図 2 B. 露髄面の強拡大

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 林 誠	4. 巻 40
2. 論文標題 Mineral trioxide aggregateから放出するカルシウムイオンの生物学的作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木裕介, 林 誠, 安川拓也, 中村健志, 羽鳥啓介, 武市 収
2. 発表標題 ケイ酸カルシウムを添加したフルオロアパタイトを形成するリン酸カルシウムセメントの辺縁封鎖性
3. 学会等名 第41回 日本歯内療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村健志, 林誠, 鈴木裕介, 安川拓也, 菅原明喜, 平野文香, 小木曾文内
2. 発表標題 Biphasic calcium phosphate cementの物質特性に関する基礎的研究 -硬化時間と経時的粘度変化およびカルシウムイオンの溶出について-
3. 学会等名 第151回秋季日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Fujikawa, A. Sugawara, A. Hirano, M. Tohyama, M. Hayashi
2. 発表標題 Histopathological Reactions and CO3-AP Formation of BCP-cement in Subcutaneous Tissues
3. 学会等名 97th IADR/AADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安川拓也, 林 誠, 黄 紀蓉, 田邊奈津子, 川戸貴行, 小木曾文内
2. 発表標題 骨芽細胞におけるcalcium-sensing receptorを介したmineral trioxide aggregateによる骨形成誘導
3. 学会等名 第146回 日本歯科保存学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	チョー ローレンス (CHOW Laurence C.)		
研究協力者	高木 章三 (TAKAGI Shozo)		
研究協力者	安川 拓也 (YASUKAWA Takuya)		